

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

18.08.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 5月10日

REC'D 05 OCT 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-137711

出 願 人
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

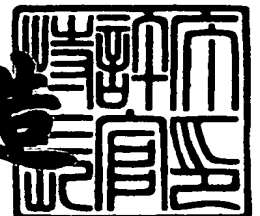
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3076047

【書類名】 特許願
 【整理番号】 H11-1949D1
 【提出日】 平成12年 5月10日

【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 A61K 7/06

【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2番地 協和醗酵工業株式会社
 筑波研究所内
 【氏名】 高橋 知也

【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2番地 協和醗酵工業株式会社
 筑波研究所内
 【氏名】 神村 彩子

【発明者】
 【住所又は居所】 三重県四日市市生桑町2273-1
 【氏名】 松岡 貴子

【特許出願人】
 【識別番号】 000001029
 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社
 【代表者】 平田 正

【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1
 【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 育毛剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脂肪酸残基部分が偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基のみから構成されるホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

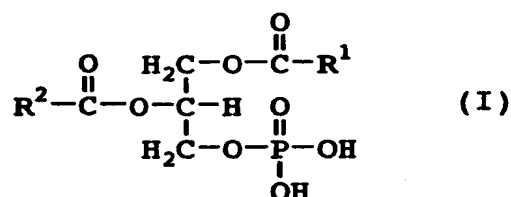
【請求項2】 実質的にミノキシジルを含有しない請求項1記載の育毛剤。

【請求項3】 ホスファチジン酸含量が0.01～5.0%である請求項1または2記載の育毛剤。

【請求項4】 ホスファチジン酸含量が0.01～1.0%である請求項1または2記載の育毛剤。

【請求項5】 ホスファチジン酸が式 (I)

【化1】



(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なって奇数直鎖の炭素鎖のアルキル、奇数直鎖の炭素鎖のアルケニルまたは奇数直鎖の炭素鎖のアルキニルを表す)で表される化合物である請求項1～4のいずれかに記載の育毛剤。

【請求項6】 ホスファチジン酸とプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩およびトコフェロールからなる群から選ばれる一つ以上とを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

【請求項7】 ホスファチジン酸とプロアントシアニジンとを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

【請求項8】 プロアントシアニジンがプロシアニジンB-1、プロシアニジンB-2、プロシアニジンB-3およびプロシアニジンC-1から選ばれる一種または二種以上のプロアントシアニジンである請求項7記載の育毛剤。

【請求項9】 プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩を含有する請求項7または8記載の育毛剤。

【請求項10】 ホスファチジン酸とプロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩とを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

【請求項11】 プロテインキナーゼC特異的阻害剤がカルフォスチンC、ヘキサデシルホスフォコリン、パルミトイル-DL-カルニチンおよびポリミキシンBから選ばれる一種または二種以上のプロテインキナーゼC阻害剤である請求項9または10記載の育毛剤。

【請求項12】 トコフェロールを含有する請求項7～11のいずれかに記載の育毛剤。

【請求項13】 ホスファチジン酸とトコフェロールとを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

【請求項14】 トコフェロールがdl- α -トコフェロール、d- α -トコフェロール、酢酸dl- α -トコフェロール、酢酸d- α -トコフェロールおよびニコチン酸dl- α -トコフェロールから選ばれる一種または二種以上のトコフェロールである請求項12または13記載の育毛剤。

【請求項15】 ホスファチジン酸が請求項1～5のいずれかに記載のホスファチジン酸である請求項7～14のいずれかに記載の育毛剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする育毛剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

男性型脱毛症の治療薬としては、多くの物質が研究されてきたが、安全かつ有効な物質は発見されていない。高血圧治療薬として用いられていたミノキシジルは、その副作用として多毛症が発症することが見出され〔ブリティッシュ ジャ

ーナル オブ デルマトロジー (British Journal of Dermatology) , 101, 593-595 (1979)]、現在では、男性型脱毛症の治療薬として用いられるようになったが、有効率や安全性・副作用の面で理想的な薬剤とは言えない。

【0003】

一方、多くの植物抽出物が伝統的に男性型脱毛症の治療に用いられてきた。例えば、センブリ (Swertia Japonica Makino) 抽出物は、毛細血管の血流亢進作用があるとされ育毛剤に用いられているが [トクシマ ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン (Tokushima Journal of Experimental Medicine) , 9, 37-59 (1962)]、その効果は十分とは言えない。

【0004】

ホスファチジン酸を含有する育毛剤としては、ミノキシジルリポソーム製剤のリポソーム構成基剤としてのホスファチジン酸の配合例が知られている (US 5 030 442)。また、奇数の炭素鎖長を有する脂肪酸残基を有するホスファチジン酸を含む養毛剤 (特公昭63-41363) または分岐鎖脂肪酸残基を有するホスファチジン酸を含む細胞賦活剤 (特開昭61-7205) が知られている。しかしながら偶数直鎖の炭素鎖長を有する脂肪酸残基のみを脂肪酸残基として有するホスファチジン酸を含む育毛剤は知られていない。また、ホスファチジン酸を含むいくつかのリン脂質の混合物が、アポトーシス抑制作用をもつことが知られている (WO 97/09989)。また、リン脂質混合物を含む育毛剤が知られている (DE 3222016 A1, DE 4113346 A1)。

【0005】

プロアントシアニジン含有する育毛剤は、WO 96/00561に記載されている。プロテインキナーゼC (PKC) 特異的阻害剤含有する育毛剤は、特開平9-315947に記載されている。トコフェロールが育毛作用を有することは知られている [毛の医学、283頁 (1987年)、文光堂；ヘアサイエンス、80頁 (1986年)、社団法人 日本毛髪科学教会]。しかしながら、ホスファチジン酸とプロアントシアニジンとを有効成分とする育毛剤、ホスファチジン酸とプロテインキナーゼC特異的阻害剤とを有効成分とする育毛剤、並びに、ホスファチジン酸とトコフェロールとを有効成分とする育毛剤については知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、脂肪酸残基部分が偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基のみから構成されるホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする、頭髮の育毛・発毛効果に優れた育毛剤、また、ホスファチジン酸とプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩およびトコフェロールからなる群から選ばれる一つ以上とを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、外用により育毛作用を有する物質を捜し、検討を重ねた結果、脂肪酸残基部分が偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基のみから構成されるホスファチジン酸に強い育毛活性を見いだした。また、ホスファチジン酸とプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩およびトコフェロールからなる群から選ばれる一つ以上とを有効成分として含有する組成物に強い育毛活性を見いだした。

本発明は、以下の(1)～(15)に関する。

【0008】

(1) 脂肪酸残基部分が偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基のみから構成されるホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

【0009】

(2) 実質的にミノキシジルを含有しない上記(1)記載の育毛剤。

【0010】

(3) ホスファチジン酸含量が0.01～5.0%である上記(1)または(2)記載の育毛剤。

【0011】

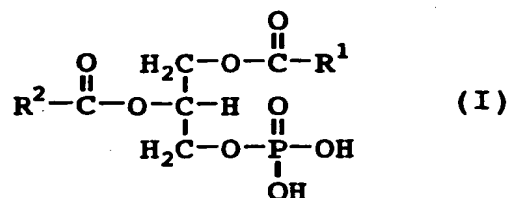
(4) ホスファチジン酸含量が0.01～1.0%である上記(1)または(2)記載の育毛剤。

【0012】

(5) ホスファチジン酸が式 (I)

【0013】

【化2】



【0014】

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なって奇数直鎖の炭素鎖のアルキル、奇数直鎖の炭素鎖のアルケニルまたは奇数直鎖の炭素鎖のアルキニルを表す)で表される化合物である上記(1)～(4)のいずれかに記載の育毛剤。

【0015】

(6) ホスファチジン酸とプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩およびトコフェロールからなる群から選ばれる一つ以上とを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

【0016】

(7) ホスファチジン酸とプロアントシアニジンとを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

【0017】

(8) プロアントシアニジンがプロシアニジンB-1、プロシアニジンB-2、プロシアニジンB-3およびプロシアニジンC-1から選ばれる一種または二種以上のプロアントシアニジンである上記(7)記載の育毛剤。

【0018】

(9) プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩を含有する上記(7)または(8)記載の育毛剤。

【0019】

(10) ホスファチジン酸とプロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩とを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤。

【0020】

(11) プロテインキナーゼC特異的阻害剤がカルフォスチンC、ヘキサデシルホスフォコリン、パルミトイル-DL-カルニチンおよびポリミキシンBから選ばれる一種または二種以上のプロテインキナーゼC阻害剤である上記(9)または(10)記載の育毛剤。

【0021】

(12) トコフェロールを含有する上記(7)～(11)のいずれかに記載の育毛剤。

【0022】

(13) ホスファチジン酸とトコフェロールとを有効成分として含有するを特徴とする育毛剤。

【0023】

(14) トコフェロールがdl- α -トコフェロール、d- α -トコフェロール、酢酸dl- α -トコフェロール、酢酸d- α -トコフェロールおよびニコチン酸dl- α -トコフェロールから選ばれる一種または二種以上のトコフェロールである上記(12)または(13)記載の育毛剤。

【0024】

(15) ホスファチジン酸が上記(1)～(5)のいずれかに記載のホスファチジン酸である上記(7)～(14)のいずれかに記載の育毛剤。

【0025】

【発明の実施の形態】

式(I)の各基の定義において、奇数直鎖の炭素鎖のアルキルとしては、例えば炭素数1～23、好ましくは7～17の、より具体的には、メチル、プロピル、ペンチル、ヘプチル、ノニル、ウンデシル、トリデシル、ペンタデシル、ヘプタデシル、ノナデシル、ヘンエイコサニル、トリコサニル等があげられる。奇数直鎖の炭素鎖のアルケニルとしては、例えば炭素数3～23、好ましくは7～17の、より具体的にはアリル、1-プロペニル、2-ペンテニル、4-ペンテニル、ペンタジエニル、ヘプテニル、ノネニル、ウンデセニル、トリデセニル、ペンタデセニル、ヘプタデセニル等があげられる。奇数直鎖の炭素鎖のアルキニルとしては、例えば炭素数3～23、好ましくは7～17の、より具体的にはプロピニル、ペンチニル

、ヘプチニル、ノニニル、ウンデシニル、トリデシニル、ペンタデシニル、ヘプタデシニル等があげられる。アルケニルおよびアルキニルにおける不飽和結合の個数は特に限定されることはない。

【0026】

本発明に用いられる脂肪酸残基部分が偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基のみから構成されるホスファチジン酸としては、脂肪酸残基部分が偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基のみから構成されるものであればいかなるものも包含される。偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基における偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸としては、例えば炭素数2~24、好ましくは8~18の、より具体的にはエタノイル、ブタノイル、ヘキサノイル、オクタノイル、デカノイル、ドデカノイル、テトラデカノイル、ヘキサデカノイル、オクタデカノイル、エイコサノイル、ドコサノイル、テトラコサノイル、2-ブテノイル、3-ブテノイル、3-ヘキセノイル、5-ヘキセノイル、ヘキサジエノイル、オクテノイル、デセノイル、ドデセノイル、テトラデセノイル、ヘキサデセノイル、オクタデセノイル、ブチノイル、ヘキシノイル、オクチノイル、デシノイル、ドデシノイル、テトラデシノイル、ヘキサデシノイル、オクタデシノイル、テトラデカ-4-エン-8-インオイル等があげられる。上記ホスファチジン酸の中でも、好ましくは式(I)で表される化合物があげられる。具体的には、ホスファチジン酸ジオレオイル、ホスファチジン酸ジミリス Toil、ホスファチジン酸ジパルミ Toil、ホスファチジン酸ジラウロイル、ホスファチジン酸ジオクタノイル、ホスファチジン酸ジデカノイル、ホスファチジン酸ジステアロイル、ホスファチジン酸アラキドノイルステアロイル等があげられる。

【0027】

また、本発明のホスファチジン酸とプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩およびトコフェロールからなる群から選ばれる一つ以上とを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤におけるホスファチジン酸としては、上記脂肪酸残基部分が偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基のみから構成されるホスファチジン酸に加えて、脂肪酸残基部分が奇数の炭素鎖の脂肪酸残基から構成されるもの、脂肪酸残基部分が偶数かつ

分岐した炭素鎖の脂肪酸残基から構成されるもの、および脂肪酸残基部分が上記各種脂肪酸残基の組み合わせからなるものも包含される。具体的には、ホスファチジン酸ジプロピオニル、ホスファチジン酸ジペンタノイル、ホスファチジン酸ジヘプタノイル、ホスファチジン酸ジノナノイル、ホスファチジン酸ジウンデカノイル、ホスファチジン酸ジトリデカノイル、ホスファチジン酸ジペンタデカノイル、ホスファチジン酸ジヘプタデカノイル、ホスファチジン酸ジ α -メチルオクタデカノイル、ホスファチジン酸ジ α -メチルウンデカノイル、ホスファチジン酸ジ β -プロピルウンデカノイル、ホスファチジン酸ジ α -メチルステアロイル、ホスファチジン酸ジ α -メチルパルミトイル、ホスファチジン酸ジ α -メチルノナノイル、ホスファチジン酸ビス(γ -ジメチルノナノイル)、ホスファチジン酸ビス(δ -エチルトリデカノイル)等があげられる。

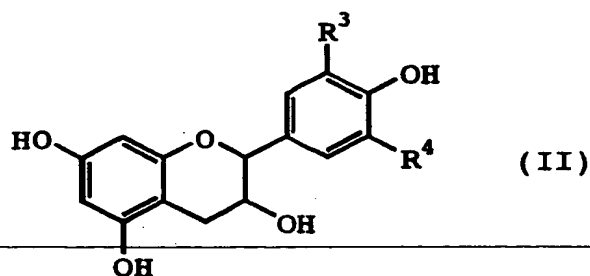
【0028】

これらのホスファチジン酸は、卵黄や大豆等から精製して得ることができる。また、市販品としてあるいは化学合成(例えば、US 3423440)によって得ることもできる。

本発明に用いられるプロアントシアニジンは、式(II)

【0029】

【化3】



【0030】

(式中、 R^3 および R^4 は同一または異なって水素原子または水酸基を表す)等で表されるフラバン-3-オール誘導体を構成単位として重合した化合物群をいう。

フラバン-3-オール誘導体の具体例としては、カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、アフゼレチン、エピアフゼレチン等があげられ、これらの光学異性体もすべて含まれるが、本発明では、エピカテキンまたはカテ

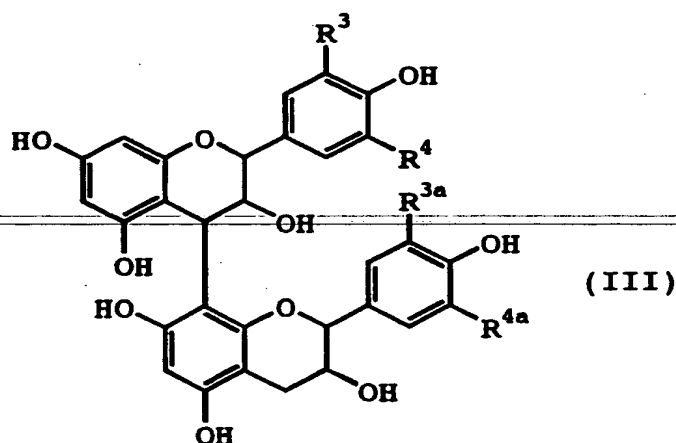
キンを構成単位とするプロアントシアニジンがより好ましく用いられる。

【0031】

式 (II) で表されるフラバン-3-オール誘導体の結合様式としては、いかなるものも含まれるが、例えばフラバン-3-オール誘導体が2個重合した2量体としては、式 (III)

【0032】

【化4】



【0033】

(式中、 R^3 および R^4 はそれぞれ前記と同義であり、 R^{3a} および R^{4a} はそれぞれ前記 R^3 および R^4 と同義である) で表される結合様式をとるものがあげられ、3量体以上の重合体としては、同一または異なるこれらの結合様式の組み合わせによるものがあげられる。

【0034】

本発明に用いられるプロアントシアニジンは、フラバン-3-オール誘導体の2量体以上であればよいが、好ましくは2~10量体、より好ましくは2~5量体、さらに好ましくは2~3量体である。フラバン-3-オール誘導体の2量体としては、例えばエピカテキン-(4 β →8)-カテキン等のエピカテキンとカテキンの結合体、エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン等のエピカテキンの2量体、カテキン-(4 α →8)-カテキン等のカテキンの2量体等があげられ、フラバン-3-オール誘導体の3量体としては、例えばエピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン等のエピカテキンの3量体、カテキン-(4 α →8)-カテキン-(4 α →8)-カテキン

等のカテキンの3量体、エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン-(4 β →8)-カテキン等のエピカテキンとカテキンの混合3量体等があげられる。

【0035】

また、これらプロアントシアニジンに没食子酸やグルコース、ラムノース等の糖類が付加した化合物も本発明に用いられるプロアントシアニジンに含まれる。

プロアントシアニジンは、ブドウ属、リンゴ属、オオムギ属、カキ属、ココヤシ属、カカオ属、マツ属、インゲン属、ナンキンマメ属等に属するブドウ、リンゴ、オオムギ、カキ、ヤシ、カカオ、マツ、アズキ、ピーナッツ等の各種の植物から抽出精製して得られる他、化学合成によっても得ることができる。

【0036】

例えば、プロアントシアニジンの植物からの抽出精製は、次のような公知の方法で行うことができる。

原料である植物の果実、種子、葉、茎、根、根茎等を適当な時期に採取した後、そのままあるいは通常空気乾燥等の乾燥工程に付し、抽出原料とする。乾燥した植物体からプロアントシアニジンの抽出を行う場合は、公知の方法〔ケミカル アンド ファーマシューティカル ブリテン(Chemical & Pharmaceutical Bulletin), 3, 3218 (1990)および同, 40, 889-898 (1992)] に準じて行うことができる。

【0037】

すなわち、原料を粉碎もしくは細切した後、溶媒を用いて抽出を行う。抽出溶媒としては、水、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類等の親水性もしくは親油性の溶媒を、単独もしくは混合溶媒として用いることができる。抽出温度は、通常0～100℃、好ましくは5～50℃である。抽出時間は、1時間～10日間程度であり、溶媒量は、乾燥原料に対して通常1～30倍重量、好ましくは5～10倍重量である。抽出操作は、攪拌または浸漬放置し、必要に応じて2～3回繰り返す。

【0038】

上記の操作で得られた粗抽出液から不溶性残渣を濾過もしくは遠心分離により

取り除いた抽出液、あるいは植物の搾汁液や樹液からのプロアントシアニジンの精製方法は、公知の分離精製方法であればどのようなものでもよいが、二相溶媒分配法、カラムクロマトグラフィー法、分取高速液体クロマトグラフィー法等を単独もしくは組み合わせて用いることが好ましい。例えば二相溶媒分配法としては、前記の抽出液から油溶性成分や色素をn-ヘキサン、石油エーテル等により抽出除去する方法、該抽出液からn-ブタノール、メチルエチルケトン等の溶媒と水との分配により、溶媒相へプロアントシアニジンを回収する方法等があげられる。カラムクロマトグラフィー法としては、順相系シリカゲル、逆相系シリカゲルを用いる方法、担体としてダイヤイオンHP-20、セパビーズSP-207等を用いる吸着カラムクロマトグラフィー法、担体としてセファデックスLH-20等を用いるゲル濾過法等があげられ、これらを単独もしくは組み合わせて用い、反復して使用することもできる。分取高速液体クロマトグラフィー法としては、オクタデシルシリカ等を用いる逆相系のカラムを用いる方法、シリカゲル等を用いる順相系のカラムを用いる方法等があげられる。

【0039】

上記精製方法により、前記の抽出液から塩類等水溶性のイオン性物質、糖類・多糖類等の非イオン性物質、油分、色素等を除去し、プロアントシアニジンを精製することができる。

また、ブドウ由来プロアントシアニジンは、アクタ デルマト ベネレオロジカ (Acta Dermato Venereologica), 78, 428-432 (1998)に記載の方法またはその方法に準じて、プロシアニジンB-1 [エピカテキン-(4 β →8)-カテキン]、プロシアニジンB-2 [エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン]、プロシアニジンB-3 [カテキン-(4 β →8)-カテキン] およびプロシアニジンC-1 [エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン] は、ジャーナル オブ インヴェスティゲイティブ デルマトロジー (The Journal of Investigative Dermatology), 112, 310-316 (1999)に記載の方法またはその方法に準じてそれぞれ抽出精製することができる。

【0040】

プロアントシアニジンの化学合成による製造は、エピカテキンまたはカテキン

の2量体の製造方法が記載されているジャーナル オブ ケミカル ソサエティー
パーキン トランサクション I (Journal of Chemical Society, Perkin Transa
ction I), 1535-1543 (1983)またはフィトケミストリー (Phytochemistry), 25
, 1209-1215 (1986)に記載の方法あるいはそれらに準じた方法により行うことが
できる。

【 0 0 4 1 】

プロアントシアニジンをも本発明の有効成分として用いる場合、プロアントシア
ニジンは、一種または二種以上混合してもよく、具体的な例としては、ブドウ種
子由来プロアントシアニジン、リンゴ由来プロアントシアニジン、マツ由来プロ
アントシアニジン、精製プロシアニジンオリゴマー、プロシアニジンB-1、プロ
シアニジンB-2、プロシアニジンB-3、プロシアニジンC-1等から選ばれる一種ま
たは二種以上、中でもプロシアニジンB-1、プロシアニジンB-2、プロシアニジン
B-3およびプロシアニジンC-1から選ばれる一種または二種以上が好ましく用いら
れる。

【 0 0 4 2 】

本発明に用いられるプロテインキナーゼC特異的阻害剤としては、プロテイン
キナーゼCを特異的に阻害するものであればいかなるものでも用いられるが、好
ましくは、プロテインキナーゼC (PKC) 阻害活性とプロテインキナーゼA (PKA)
阻害活性を以下に示すPKC阻害活性測定法およびPKA阻害活性測定法で測定したと
き、PKAの50%阻害定数 (以下、PKA-IC₅₀と略す) とPKCの50%阻害定数 (以下、
PKC-IC₅₀と略す) の比 (以下、PKA-IC₅₀/PKC-IC₅₀と略す) が3以上、好ましくは
3~10⁹、より好ましくは10~10⁹であるプロテインキナーゼ阻害剤が用いられる
。具体的には、カルフォスチンG、ヘキサデシルホスフォコリン、パルミトイル
DL-カルニチン、ポリミキシンBまたはそれらの薬理学的に許容される塩等から選
ばれる一種または二種以上をあげることができる。

【 0 0 4 3 】

これらの薬理学的に許容される塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、
硝酸塩、蟻酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩
、酒石酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン

酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等があげられる。

PKC阻害活性測定法およびPKA阻害活性測定法について以下に示す。

(1) PKC阻害活性測定法

PKCの阻害活性の測定は、吉川らの方法[ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry), 257, 13341 (1982)] に準じて行うことができる。

【0044】

2.5 μmol 酢酸マグネシウム、50 μg ヒストンタイプIIIS (シグマ社製)、20 μg ホスファチジルセリン、0.8 μg ダイオレイン、25 nmol 塩化カルシウム、5 μg 粗酵素 (吉川らの方法によりラットの脳より部分精製したもの) および5 μmol トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を含む250 μl 水溶液に検体を含む前記水溶液 (10 μl) を加え、30℃で3分間インキュベートする。インキュベート後、1.25 nmol [γ - ^{32}P] ATP (5~10 $\times 10^3$ cpm/nmol) を加え、30℃で3分間リン酸化反応を行い、25%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させる。該反応液を酢酸セルロース膜 (ポアサイズ0.45 μm) (東洋濾紙社製) で濾過し、5%トリクロロ酢酸で4回洗浄後、該膜上に残った放射活性を測定し検体値とする。また、上記操作を検体を加えないで行い、放射活性を測定し対照値とする。

【0045】

対照値に対して、50%の検体値を示すときの検体のモル濃度を、PKCの50%阻害定数 (PKC-IC₅₀) とする。

(2) PKA阻害活性測定法

PKAの阻害活性の測定は、クオ (Kuo) らの方法[バイオケミストリー (Biochemistry), 64, 1349 (1969)] に準じて行うことができる。

【0046】

5 μmol トリス塩酸緩衝液 (pH6.8)、2.5 μmol 酢酸マグネシウム、100 μg ヒストンタイプIIIS (シグマ社製)、0.25 nmol c-AMPおよび200 μg 粗酵素 [クオ (Kuo) らの方法により子牛の心臓より部分精製したもの] を含む250 μl の水溶液に検体を含む前記水溶液 (10 μl) を加え、30℃で3分間インキュベートする。インキュベート後、1.25 nmol [γ - ^{32}P] ATP (5~10 $\times 10^3$ cpm/nmol) を加え、30℃で3分

間リン酸化反応を行い、25%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させる。該反応液を酢酸セルロース膜（ポアサイズ $0.45\mu\text{m}$ ）（東洋濾紙社製）で濾過し、5%トリクロロ酢酸で4回洗浄後、該膜上に残った放射活性を測定し検体値とする。

また、上記操作を検体を加えないで行い、放射活性を測定し対照値とする。

【0047】

対照値に対して、50%の検体値を示すときの検体のモル濃度をPKAの50%阻害定数（PKA-IC₅₀）とする。

本発明に用いられるトコフェロールとしては、例えば市販されている天然由来品、合成品のいずれも用いることができ、また、酢酸エステルやニコチン酸エステル等の誘導体を用いることもできる。具体的には、dl- α -トコフェロール、d- α -トコフェロール、酢酸dl- α -トコフェロール、酢酸d- α -トコフェロール、ニコチン酸dl- α -トコフェロール等があげられる。

【0048】

本発明の育毛剤の剤型としては、ホスファチジン酸、あるいは該ホスファチジン酸とプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理的に許容される塩およびトコフェロールからなる群から選ばれる一つ以上とを配合しうる剤型であればどのような剤型を用いることもできる。例えば、適当な医薬基剤と配合して液状あるいは固形状の育毛剤として用いることができる。

【0049】

液状または固形状の育毛剤型としては、ヘヤーリキッド、ヘヤートニック、ヘヤーローション等の液状剤型、軟膏、ヘヤークリーム等の固形状剤型があげられ、各々好適な基剤に本発明に用いられるホスファチジン酸、あるいは該ホスファチジン酸と、~~プロアントシアニジン、プロテインキナーゼC阻害剤またはトコフェ~~ロールを添加し、常法により製造することができる。

【0050】

本発明の育毛剤中のホスファチジン酸の含有量は、ホスファチジン酸の種類や物性に由来する経皮吸収性によって大きく異なるが、単独または混合物として通常0.01~5.0重量%（以下、単に%という）、好ましくは0.01~3.0%、より好ましくは、0.1~1.0%である。プロアントシアニジンの含有量は、精製度によって

異なるが、通常0.01~10.0%、好ましくは0.1~5.0%、より好ましくは0.3~2.0%である。また、プロテインキナーゼC阻害剤の含有量は、阻害活性の強さや物性に由来する経皮吸収性によって大きく異なるが、単独または混合物として通常0.00001~1%、好ましくは0.0001~1%、より好ましくは0.001~0.1%である。

トコフェロールの含有量は通常0.01~2%、好ましくは0.05~1%、より好ましくは0.1~0.5%である。

【0051】

液状剤型に好適な基剤としては、育毛剤に通常使用されているもの、例えば精製水、エチルアルコール、多価アルコール類があげられ、必要により添加剤を添加してもよい。

多価アルコールとしては、グリセロール、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコール等があげられる。

【0052】

添加剤としては、界面活性剤、ビタミン類、消炎剤、殺菌剤、ホルモン剤、生薬エキス、チンキ類、清涼剤、保湿剤、角質溶解剤、酸化防止剤、金属イオン封鎖剤、香料等があげられる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン (60) 硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレン (8) オレイルエーテル、ポリオキシエチレン (10) オレイルエーテル、モノオレイン酸ポリオキシエチレン (10)、ポリオキシエチレン (30) グリセリルモノステアレート、モノステアリン酸ソルビタン、モノステアリン酸ポリオキシエチレン (30) グリセリル、モノオレイン酸ポリオキシエチレン (20) ソルビタン、ショ糖脂肪酸エステル、モノオレイン酸ヘキサグリセリン、モノラウリン酸ヘキサグリセリン、ポリオキシエチレン還元ラノリン、ポリオキシエチレン (20) ラノリンアルコール、ポリオキシエチレン (25) グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル、N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル等があげられる。

【0053】

ビタミン類としては、ニコチン酸ベンジル、ニコチン酸アミド、D-パントテニルアルコール、パントテニルエチルエーテル、ビオチン、塩酸ピリドキシン、リ

ボフラビン等があげられる。

消炎剤としては、グリチルリチン酸ジカリウム、 β -グリチルレチン酸、アラントイン、塩酸ジフェンヒドラミン、グアイアズレン、1-メントール等があげられる。

【0054】

殺菌剤としては、トリクロロヒドロキシジフェニルエーテル、ヒノキチオール、トリクロサン、クロルヘキシジングルコン酸塩、フェノキシエタノール、レゾルシン、イソプロピルメチルフェノール、アズレン、サリチル酸、ジンクピリチオン、塩化ベンザルコニウム、感光素301号、モノニトログアヤコールナトリウム等があげられる。

【0055】

ホルモン剤としては、エチニルエストラジオール、エストロン、エストラジオール等があげられる。

生薬エキスとしては、センブリエキス、ニンニクエキス、ニンジンエキス、アロエエキス、キナエキス等があげられる。

チンキ類として、トウガラシチンキ、ショウキョウチンキ、カンタリスチンキ等があげられる。

【0056】

清涼剤としては、トウガラシチンキ、1-メントール、カンフル等があげられる。

保湿剤としては、L-ピロリドンカルボン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸、冬虫夏草抽出物、サフラン抽出物等があげられる。

角質溶解剤としては、レゾルシン、サリチル酸、乳酸等があげられる。

【0057】

酸化防止剤としては、ブチルヒドロキシアニソール、イソプロピルガレート、没食子酸プロピル、エリソルビン酸等があげられる。

金属イオン封鎖剤としては、エチレンジアミンテトラアセテートまたはその塩等があげられる。

香料としては、オレンジ油、レモン油、ベルガモット油、ライム油、レモンゲ

ラス油、ラベンダー油等の天然香料およびメントール、ローズオキサイド、リナロール、シトラル、酢酸リナリル等の合成香料があげられる。

【0058】

上記の液状剤型を噴霧剤として用いるときは、可燃ガス、不燃ガス等を用いることができる。可燃ガスとしては、LPG（液化石油ガス）、ジメチルエーテル等があげられ、不燃ガスとしては、窒素ガス、炭酸ガス等があげられる。

固体状剤型の基剤としては、ワセリン、固形パラフィン、植物油、鉱物油、ラノリン、ろう類、マクロゴール等があげられ、必要により前記の添加剤、レシチン等の乳化剤、エチルアルコール、イソプロピルアルコール等の低級アルコール等を添加してもよい。

【0059】

本発明の育毛剤の投与量は年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、成人一人当たり、一回にホスファチジン酸として0.1~250mg、好ましくは1mg~100mgが一日一回から数回、経皮投与される。

次に、実施例により本発明を詳細に説明する。

【0060】

【実施例】

実施例1：組成物1および組成物2の作製

ホスファチジン酸ジオレオイル（シグマ社製）	0.4%
エチルアルコール	70%
1,3-ブチレングリコール	3%
N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル	0.25%
ポリオキシエチレン（25）グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%

【0061】

上記混合物に精製水を加えて100%とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物1を調製した。

上記組成物において、ホスファチジン酸ジオレオイルの代わりに精製水を加えて、組成物2として調製した。

【0062】

実施例 2 : 組成物 3 および組成物 4 の作製

ホスファチジン酸ジオレオイル (シグマ社製)	1%
プロシアニジン B-2	1%
エチルアルコール	70%
1,3-ブチレングリコール	3%
N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル	0.25%
ポリオキシエチレン (25) グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%

【0063】

プロシアニジン B-2 は、ジャーナル オブ インヴェスティゲイティブ デルマトロジー (The Journal of Investigative Dermatology), 112, 310-316 (1999) に記載の方法に従って製造した。

上記混合物に精製水を加えて 100% とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物 3 を調製した。

上記組成物において、ホスファチジン酸ジオレオイルの代わりに精製水を加えて、組成物 4 として調製した。

【0064】

実施例 3 : 組成物 5 および組成物 6 の作製

ホスファチジン酸ジオレオイル (シグマ社製)	1%
プロシアニジン C-1	1%
エチルアルコール	70%
1,3-ブチレングリコール	3%
N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル	0.25%
ポリオキシエチレン (25) グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%

【0065】

プロシアニジン C-1 は、ジャーナル オブ インヴェスティゲイティブ デルマトロジー (The Journal of Investigative Dermatology), 112, 310-316 (1999)

に記載の方法に従って製造した。

上記混合物に精製水を加えて100%とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物5を調製した。

上記組成物において、ホスファチジン酸ジオレオイルの代わりに精製水を加えて組成物6として調製した。

【0066】

実施例4：組成物7および組成物8の作製

ホスファチジン酸ジオレオイル（シグマ社製）	1%
ヘキサデシルホスフォコリン（シグマ社製）	0.3%
エチルアルコール	70%
1,3-ブチレングリコール	3%
N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル	0.25%
ポリオキシエチレン（25）グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%

【0067】

上記混合物に精製水を加えて100%とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物7を調製した。

上記組成物において、ホスファチジン酸ジオレオイルの代わりに精製水を加えて組成物8として調製した。

【0068】

実施例5：組成物9および組成物10の作製

ホスファチジン酸ジオレオイル（シグマ社製）	1%
dl- α -トコフェロール（エーザイ社製）	1%
エチルアルコール	70%
1,3-ブチレングリコール	3%
N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル	0.25%
ポリオキシエチレン（25）グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%

【0069】

上記混合物に精製水を加えて100%とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物9を調製した。

上記組成物において、ホスファチジン酸ジオレオイルの代わりに精製水を加えて、組成物10として調製した。

【0070】

実施例6：組成物11および組成物12の作製

ホスファチジン酸ジラウロイル（フナコシ社製）	0.2%
エチルアルコール	70%
1,3ブチレングリコール	3%
N-アセチルグルタミンイソステアリルエステル	0.25%
ポリオキシエチレン（25）グリセリルピログルタミン酸イソステアリン酸ジエステル	0.25%

【0071】

上記混合物に精製水を加えて100%とし、これらを攪拌しながら加えて均一にして、組成物11を作製した。

【0072】

参考例1：PKC-IC₅₀およびPKA-IC₅₀の測定

カルフォスチンC、ヘキサデシルホスフォコリン、パルミトイル-DL-カルニチンおよびポリミキシンBについて、前述のPKC阻害活性測定法およびPKA阻害活性測定法に従って、PKC阻害活性およびPKA阻害活性を測定し、PKC-IC₅₀およびPKA-IC₅₀を求めた。

結果を第1表に示す。

【0073】

【表1】

第1表

検体	PKC-IC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)	PKA-IC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)	PKA-IC ₅₀ / PKC-IC ₅₀
カルフォスチンC	0.05	>50	>1000
ヘキサデシルホスホリッ	94	>1000	>10.6
パルミトイル-DL-カルニチン	230	>1000	>4.3
ホリキシソB	2.6	>1000	>384

【0074】

次に、本発明の育毛剤の作用について、試験例により具体的に示す。

試験例1：マウス毛包上皮細胞培養に対する促進効果

毛包上皮細胞の分離および培養はTanigakiらの方法【アーカイヴズ オブ デルマトロジカル リサーチ (Archives of Dermatological Research) , 284, 290-296 (1992)] を改変して行った。

【0075】

すなわち、4日令のC3Hマウス（日本チャールスリバー）の背部皮膚を採取し、500単位/mlのディスパーゼ（合同酒清）および5%ウシ胎児血清（FCS）を含むMEM培地（Eagle's Minimum Essential Medium）で4℃、16時間処理した。

得られた皮膚切片から表皮を剥離し、真皮層を0.25%コラゲナーゼN-2（新田ゼラチン）および10%FCSを含むDMEM培地（Dulbecco's modified Eagle Medium）で37℃、1時間処理し真皮懸濁液を得た。真皮懸濁液を212ミクロンのナイロンメッシュ（日本理化学機械）で濾過後、濾液を1000rpmで5分間遠心分離し、毛包組織を含むペレットを得た。ペレットに、カルシウム・マグネシウムフリーPBS（Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline）溶液を加え、ピペットを用いて懸濁後、15分間静置することにより毛組織を沈降させた。得られた毛組織を用いて、上記ペレットで行った、カルシウム・マグネシウムフリーPBS溶液の添加、ピペットによる懸濁、15分間静置・沈降操作と同様の操作を3回繰り返した。

【0076】

得られた毛組織に0.1%エチレンジアミン四酢酸（EDTA）-0.25%トリプシン

液（ギブコ社製）を加え、37℃で5分間処理後、10%FCSを含むDMEM培地を加え、 3×10^5 /mlの細胞濃度の毛組織細胞液を調製した。毛組織細胞液を24穴コラーゲンコートプレート（イワキガラス社製）へ1ml/ウェルずつ播種し、37℃、5%CO₂存在下で24時間培養を行った。

【0077】

培養後、MCDB153培地（極東製薬社製）にウシインシュリン（シグマ社製）5mg/L；マウス上皮増殖因子（EGF）（宝酒造社製）5μg/L；ウシ下垂体抽出物（極東製薬社製）40mg/L；ヒトトランスフェリン（シグマ社製）10mg/L；ハイドロコチゾン（シグマ社製）0.4mg/L；プロゲステロン（コラボラティブ リサーチ社製）0.63μg/L；0-ホスホエタノールアミン（シグマ社製）14mg/L；エタノールアミン（シグマ社製）6.1mg/L；ペニシリン（和光社製）50U/ml；ストレプトマイシン（和光社製）50μg/ml；ホスファチジン酸ジオレオイル（シグマ社製）、ホスファチジン酸ジミリストイル（フナコシ社製）、ホスファチジン酸ジパルミトイル（和光純薬社製）、ホスファチジン酸ジラウロイル（フナコシ社製）または卵黄由来のホスファチジン酸（シグマ社製）；および／またはプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはトコフェロールを含むDMSO溶液（1/100体積加えた）を添加した培地へ培地交換し、さらに、37℃、5%CO₂存在下で5日間培養を行った。なお培地は一日おきに交換した。

【0078】

なお、上記培地において、ホスファチジン酸、およびプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはトコフェロールを含むDMSO溶液の代わりにDMSOのみを1/100体積量加えた培地で培養したものを対照群とした。

細胞増殖度の測定は、MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] を用いた方法で行った [実験医学別冊 バイオマニュアルUP シリーズ 分子生物学研究のための培養細胞実験法、89-92頁、羊土社（1995年）]。

【0079】

24穴マイクロプレート（2cm²/ウェル）の各ウェルに培養液1mlに対し1/10体積のMTTのPBS溶液（5mg/ml）を加え、揺らして均一にし、37℃、5%CO₂存在下で4

時間培養した。4時間後培養液を吸引し、各々のプレートに1mlの0.04N HClイソプロピルアルコール溶液を加え、ウェル中に生成したフォルマザンが完全に溶けるまで混和した。

650nmを対照とし、570nmにおける吸光度を測定し、細胞の増殖度を測定した。

本発明における化合物の増殖促進活性を第2表に示す。

【0080】

【表2】

第2表

有効成分	対照群の増殖を 100 としたときの相対増殖度
プロシアニジンB-2 (10 $\mu\text{mol/l}$)	251
プロシアニジンB-2 + ホスファチジン酸ジオレイル (10 $\mu\text{mol/l}$) (10 $\mu\text{mol/l}$)	346
カルフォスチンC (0.01 $\mu\text{mol/l}$)	172
カルフォスチンC + ホスファチジン酸* (0.01 $\mu\text{mol/l}$) (20 $\mu\text{mol/l}$)	314
dl- α -トコフェロール (30 $\mu\text{mol/l}$)	199
dl- α -トコフェロール + ホスファチジン酸* (30 $\mu\text{mol/l}$) (20 $\mu\text{mol/l}$)	341
ホスファチジン酸ジテラシル (10 $\mu\text{mol/l}$)	379
ホスファチジン酸ジミリストイル (10 $\mu\text{mol/l}$)	361
ホスファチジン酸ジパルミトイル (20 $\mu\text{mol/l}$)	314
ホスファチジン酸ジオレイル (10 $\mu\text{mol/l}$)	255
ホスファチジン酸* (20 $\mu\text{mol/l}$)	273

*卵黄レチン由来のホスファチジン酸

【0081】

第2表に示すように、本発明におけるホスファチジン酸は著しいマウス毛包上皮細胞増殖活性を示した。また、プロアントシアニジン、プロテインキナーゼC

特異的阻害剤、トコフェロール各々のマウス毛包上皮細胞増殖活性は、ホスファチジン酸と混合することによって増強された。

試験例 2 : マウスの発毛に対する効果

小川らの方法 [ジャーナル オブ デルマトロジ (The Journal of Dermatolog y), 10, 45-54 (1983)] を参考に、マウスによる発毛効果の試験を行った。

【 0 0 8 2 】

毛周期の休止期にある 9 週令の C3H/HeSlc 雄性マウス (一群 4~5 匹) の背部毛を電気バリカンと電気シェーバーで剃毛し、実施例 1~5 で作製した組成物を一日一回、剃毛部に 200 μ l ずつ均一に塗布した。組成物 2 を対照群とした。

試験塗布開始後 18 日目のマウス背部皮膚を採取し、写真撮影を行った後、画像解析処理装置 (アビオニクス社製、スピカ II) を用いて背部皮膚全面積に対する発毛部の 100 分率を求め、被検薬剤群の発毛率の値から対照群の発毛率の値を差し引いた値を増加発毛面積率 (%) とした。

結果を第 3 表に示した。

【 0 0 8 3 】

【表 3】

第 3 表

組成物	増加発毛面積率(%)
2 (対照群)	0
1	44
3	51
4	40
5	55
6	44
7	58
8	46
9	52
10	39
11	41

【 0 0 8 4 】

第3表で示したように、本発明のホスファチジン酸を含有する育毛剤では、顕著なマウスの毛包成長促進効果が見られた。また、プロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤、トコフェロール各々の毛包成長促進効果は、ホスファチジン酸と混合することによって増強された。

【0085】

【発明の効果】

本発明によれば、脂肪酸残基部分が偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基のみから構成されるホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする、頭髮の育毛・発毛効果に優れた育毛剤、また、ホスファチジン酸とプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩およびトコフェロールからなる群から選ばれる一つ以上とを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤を提供することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 頭髮の育毛・発毛効果に優れた育毛剤を提供すること。

【解決手段】— 脂肪酸残基部分が偶数かつ直鎖の炭素鎖の脂肪酸残基のみから構成されるホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする育毛剤、また、ホスファチジン酸とプロアントシアニジン、プロテインキナーゼC特異的阻害剤またはその薬理学的に許容される塩およびトコフェロールからなる群から選ばれる一つ以上とを有効成分として含有することを特徴とする育毛剤を提供する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)